


 Europäisches Patentamt
 European Patent Office
 Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 219 781**
A2

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 86114095.2

(51) Int. Cl.⁴: **C 12 P 21/02**
C 07 K 15/26, C 12 N 15/00
A 61 K 45/02

(22) Anmeldetag: 11.10.86

(30) Priorität: 17.10.85 DE 3536939

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
 29.04.87 Patentblatt 87/18

(84) Benannte Vertragsstaaten:
 AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
 Postfach 80 03 20
 D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Engels, Joachim, Prof. Dr.
 Feldbergstrasse 1
 D-6242 Kronberg/Taunus(DE)

(72) Erfinder: Leineweber, Michael, Dr.
 Heimchenweg 74
 D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Seipke, Gerhard, Dr.
 Brunnenweg 4
 D-6200 Wiesbaden(DE)

(72) Erfinder: Uhlmann, Eugen, Dr.
 Zum Talblick 31
 D-6246 Glashütten/Taunus(DE)

(72) Erfinder: Ulmer, Wolfgang, Dr.
 Dr. Fuchs-Strasse 8
 D-6382 Friedrichsdorf(DE)

(72) Erfinder: Wetekam, Waldemar, Dr.
 Zeilring 40/I
 D-6239 Eppstein/Taunus(DE)

(54) Biologisch aktive Derivate des Human-gamma-Interferons, ihre Herstellung und Arzneimittel, die solche Derivate enthalten.

(57) Proteine mit Human- γ -Interferon-Aktivität werden erhalten, wenn man Proteine oder Fusionsproteine, die eine Aminosäuresequenz enthalten, die im wesentlichen der von Human- γ -Interferon entspricht, proteolytisch spaltet, wobei ein Fragment erhalten wird, das mit ⁶Pro beginnt. Diese Proteine können auch in an sich bekannter Weise gentechnisch hergestellt werden.

EP 0 219 781 A2

Biologisch aktive Derivate des Human- γ -Interferons, ihre
Herstellung und Arzneimittel, die solche Derivate enthalten

- Die ursprünglich veröffentlichte Aminosäuresequenz von Human- γ -Interferon, im folgenden IFN- γ , wies 146 Aminosäuren auf (Devos et al., Nucl. Acids Res. 10 (1982) 2487). Nach einer späteren Veröffentlichung (Rinderknecht et al., J. Biol. Chem. 259 (1984) 6790) fehlen jedoch dem "reifen" IFN- γ die ersten drei Aminosäuren aus der ursprünglich publizierten Sequenz. Im folgenden wird jedoch bei der Numerierung der Aminosäuren die Sequenz von Devos et al. beibehalten.
- 10 Aus der europäischen Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 146 944 ist es bekannt, gentechnisch Derivate des IFN- γ herzustellen, bei denen in Position 9 Lys durch Gln ersetzt ist und zusätzlich weitere Modifikationen durchgeführt sind. Unter diesen Modifikationen sind auch N-terminale Verkürzungen um 4 bzw. 7 Aminosäuren, die durch Bal. 31-Verdauung der DNA und Expression gewonnen wurden. Diese Derivate des IFN- γ sollen eine dem natürlichen IFN- γ vergleichbare oder sogar erhöhte Aktivität besitzen.
- 20 Es wurde auch schon vorgeschlagen (nicht vorveröffentlichte deutsche Offenlegungsschrift 3 414 831), Derivate des IFN- γ herzustellen, bei denen die ersten vier Aminosäuren der natürlichen Sequenz entfallen können, ohne daß die biologische Aktivität des IFN- γ nennenswert beeinträchtigt wäre und/oder die nach der Aminosäure 127 (Alanin) folgenden Aminosäuren eliminiert werden können, wobei ebenfalls biologisch aktive Produkte erhalten werden.
- 25 Es wurde nun gefunden, daß auch nach Abspaltung der Aminosäure in Position 5 (Asp) der natürlichen Sequenz ein biologisch aktives IFN- γ erhalten wird. Die Erfindung betrifft somit Teilsequenzen des IFN- γ , deren Aminosäuresequenz mit der Position 6 (Pro) beginnt und mindestens bis zur Position 127 (Ala) reicht. Weitere Aspekte der Erfindung und ihre bevorzugten Ausgestaltungen sind im folgenden bzw. in den Patentansprüchen wiedergegeben.
- 30
- 35

Es wurde weiterhin gefunden, daß man die erfindungsgemäßen verkürzten IFN- γ -Teilsequenzen besonders vorteilhaft durch Säurespaltung der Asp-Pro-Bindung (Piszkiewicz et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 40
5 (1970) 1173) und Renaturierung herstellen kann. Es ist überraschend, daß unter diesen drastischen Bedingungen ein biologisch aktives IFN- γ -Derivat erhalten wird, da IFN- γ als säurelabil gilt (z.B. europäische Patentanmeldung 88 540, Seite 5, Zeilen 33 - 36).

10

Als Ausgangsmaterial für dieses Verfahren dienen alle Polypeptide, die entsprechend dem natürlichen IFN- γ in Position 5 Asparaginsäure und in Position 6 Prolin enthalten. Vorteilhaft führt man diese Spaltung mit Fusions-
15 proteinen durch, die N-terminal vor der Asparaginsäure und gegebenenfalls vor weiteren Aminosäuren der natürlichen oder einer abgewandelten IFN- γ -Sequenz eine mehr oder weniger lange Aminosäuresequenz eines beispielsweise bakteriellen Proteins gebunden enthalten.

20

Diese Säurespaltung von Polypeptiden mit der Aminosäurefolge Asp-Pro ist nicht auf natürliches IFN- γ beschränkt, sondern grundsätzlich für alle Polypeptide mit im wesentlichen IFN- γ -Aminosäurefolge brauchbar, die hinreichend
25 säurestabil sind, so daß die erhaltenen Spaltprodukte - oder gegebenenfalls nur das erwünschte Spaltprodukt - nicht oder nicht irreversibel verändert werden.

Die Verfahrensbedingungen richten sich naturgemäß nach
30 der Säurestabilität der Spaltprodukte bzw. des erwünschten Spaltprodukts und sind zweckmäßig durch einfache Vorversuche zu ermitteln. Als Säuren verwendet man vorteilhaft Ameisensäure, Salzsäure oder andere vergleichbare, nicht-oxidierende Säuren wie verdünnte Schwefelsäure, Phosphor-
35 säure, halogenierte Essigsäuren oder Sulfonsäuren.

- Da die Reaktion im wäßrigen Medium erfolgt, sind grundsätzlich Temperaturen von etwa 0 bis etwa 100°C möglich. Bei niedrigen Temperaturen verläuft das Verfahren schonender, benötigt aber mehr Zeit. Temperaturen in der Nähe des
- 5 Siedepunktes erfordern zwar weniger Zeit, sind aber nur für sehr stabile Produkte brauchbar. Bevorzugt wird deshalb ein Temperaturbereich von 10 bis 70, insbesondere von 20 bis 60°C. Die Säurekonzentration im wäßrigen Medium richtet sich nach der Stärke der Säure und der Empfind-
- 10 lichkeit des Produktes. Vorteilhaft verwendet man Ameisensäure in einem Konzentrationsbereich von 70 bis 80 Gew.-%, bezogen auf das wäßrige Medium.

- Das Spaltungsverfahren kann in homogener oder heterogener
- 15 Phase durchgeführt werden. Relativ niedermolekulare Proteine werden zweckmäßig in der wäßrigen Säurelösung gelöst oder zunächst suspendiert bzw. teilweise gelöst, worauf dann im Laufe des Verfahrens eine mehr oder weniger vollständige Auflösung eintritt.

- 20 Nach Abschluß der spezifischen Säurespaltung wird das Reaktionsgemisch zweckmäßig neutralisiert, vorteilhaft unter Kühlung, und das gewünschte Produkt nach an sich bekannten Methoden abgetrennt und renaturiert. Man kann beispielsweise
- 25 ein geeignetes Adsorptionsmittel dem Gemisch zusetzen und aus dem beladenen Adsorbens das gewünschte Produkt eluieren. Zusätzlich oder an Stelle der vorstehend beschriebenen Maßnahme kann auch das Produkt durch eine oder mehrere Fällungsoperationen gereinigt werden. Es ist auch
- 30 möglich, das gewünschte Polypeptid mit Hilfe einer mit spezifischen Antikörpern beladenen Säule zu isolieren.

- Die Herstellung der erfindungsgemäßen verkürzten IFN- γ -Teilsequenzen und der biologisch aktiven Analoga kann vor-
- 35 teilhaft durch gentechnische Verfahren erfolgen, bei denen in einem Wirtsorganismus, vorzugsweise E. coli, ein Gen exprimiert wird, das für die erfindungsgemäßen Aminosäure-

Wenn die gentechnische Synthese der erfindungsgemäßen IFN- γ -
10 Derivate nach dem Verfahren der deutschen Offenlegungs-
schrift 3 409 966 bzw. der europäischen Patentanmeldung
mit der Veröffentlichungsnummer 155 590 erfolgt, entfallen
in dem synthetischen Gen die Codons für die ersten fünf
Aminosäuren der IFN- γ -Sequenz. Bei der Synthese des Gens
15 können also beispielsweise an Stelle der Bausteine Ia bis
Id in der DNA-Sequenz II die folgenden Oligonucleotide
eingesetzt werden:

	Glu	Asn	(Leu)	(Lys)	
5'	GAA	AAC			3'
25 3'	CTT	TTG	GAC	TTT	5'

Möglich ist auch die gentechnische Synthese nach dem in deutschen Offenlegungsschrift 3 414 831 (europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 161 504) vorgeschlagenen Verfahren. In dieser Anmeldung sind auch mehrere Variationen modifizierter DNA-Sequenzen aufgeführt, die zu IFN- γ -Analogen mit veränderter Aminosäuresequenz führen.

Die synthetischen Gene können natürlich auch in Genkonstruktionen eingebaut werden, die bei der Expression zu Fusionsproteinen führen. Solche Verfahren sind in großer Zahl bekannt. Hier soll nur beispielhaft auf die europäischen Patentanmeldungen mit den Veröffentlichungsnummern 1930 und 12494 verwiesen werden, in denen Fusionsproteine mit einem β -Galactosidaseanteil beschrieben sind. Man kann so unlösliche Fusionsproteine gewinnen, die leicht von den anderen Proteinen abzutrennen und zu reinigen sind. Diese Fusionsproteine werden dann zweckmäßig der vorstehend beschriebenen Proteolyse unterworfen.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung näher erläutert. Prozentangaben beziehen sich hierbei auf das Gewicht, wenn nichts anderes angegeben ist.

Beispiel 1

(Direktexpression)

10 μ g des Plasmids gemäß Figur 5 der deutschen Offenlegungsschrift 3 409 966, das das IFN- γ -Gen enthält, werden mit den Restriktionsendonucleasen Bam HI und Sal I geschnitten. Auf einem 2 %igen niedrigschmelzenden Agarosegel wird anschließend ein etwa 340 bp umfassendes Genfragment vom Restplasmid abgetrennt und (nach Maßgabe des Herstellers der Agarose) isoliert. Das isolierte Genfragment entspricht den in der Deutschen Offenlegungsschrift 3 409 966 beschriebenen DNA-Sequenzen IFN-I und IFN-II aus der DNA-Sequenz II (Aminosäuren 35-146).

An dieses Genfragment wird nun ein neu kombiniertes Genfragment ligiert, das seinerseits durch Ligationsreaktion der DNA-Sequenz

- 6 -

			Met	Pro	Tyr	Val	Lys	Glu	Ala
5'	AA	TTC	ATG	CCG	TAC	GTT	AAA	GAA	GCT
3'	(Eco RI)	G	TAC	GGC	ATG	CAA	TTT	CTT	CGA

5	Glu	Asn	(Leu)	(Lys)	
5'	GAA	AAC			3'
3'	CTT	TTG	GAC	TTT	5'

und den Oligonucleotiden Ig bis Ij der DNA-Sequenz II
 10 (IFN-I) der deutschen Offenlegungsschrift 3 409 966 erhalten wird. Anschließend wird das so erhaltene um die ersten fünf Aminosäuren verkürzte IFN- γ -Gen mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I nachgeschnitten und
 15 das 414 bp umfassende Gen durch Gelelektrophorese aus einem 2 %igen Agarosegel abgetrennt.

Das Expressionsplasmid gemäß Figur 5 der deutschen Offenlegungsschrift 3 409 966 wird mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sal I geöffnet, das darin enthaltene IFN- γ -Gen
 20 in einem 0,7 %igen Agarosegel abgetrennt und das Restplasmid mit dem neu konstruierten verkürzten IFN- γ -Gen mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase ligiert. Transformation, Anzucht und Induktion des verkürzten IFN- γ -Gens erfolgen in bekannter Weise, beispielsweise gemäß deutscher Offenlegungsschrift 3 409 966 bzw. nach dem in der deutschen
 25 Offenlegungsschrift 3 414 831 vorgeschlagenen Verfahren. Man erhält ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz 6-146 von IFN- γ , N-terminal verlängert um Met.

30 Beispiel 2

a) Herstellung eines Fusionsproteins

Man geht aus von dem synthetischen Gen gemäß der
 35 deutschen Offenlegungsschrift 3 409 966 (europäische Anmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 155 590), das wie folgt an das β -Galactosidasgen gekoppelt wird:

- 7 -

Das Plasmid gemäß Figur 5 dieser Offenlegungsschrift (oder das nach Beispiel 1 erhaltene analoge Plasmid mit der verkürzten IFN- γ -Sequenz) wird mit Sal I aufgeschnitten und mit dem folgenden Sal I-Eco RI-Adaptor ligiert:

```

5      5' TCG ACC CGG GCT G      3'
      3'      GG GCC CGA CTT AA 5'
      (Sal I)      (Eco RI)

```

10 Aus dem Ligierungsprodukt wird mit Eco RI das verlängerte Gen, das jetzt an beiden Enden von Eco RI-Erkennungssequenzen flankiert ist, abgetrennt, über ein 2 %iges niedrigschmelzendes Agarosegel gereinigt und
15 isoliert.

Das Plasmid pBH 20 (E.L. Winnacker, Gene und Klone, eine Einführung in die Gentechnologie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1984), S. 233 - 234; europäische
20 Patentanmeldung 12 494, Fig. 1) wird mit dem Restriktionsenzym Eco RI geöffnet und das Gen mit der IFN- γ -Sequenz in das linearisierte Plasmid eingesetzt. Nach Transformation und Induktion wird ein Fusionsprotein gebildet, das im Anschluß an die ersten etwa 1000 Amino-
25 säuren der β -Galactosidase die (komplette bzw. verkürzte) Aminosäuresequenz des IFN- γ enthält.

b) Proteolyse des Fusionsproteins

30 1 g des angereicherten Fusionsproteins wird in 100 ml 70 %iger Ameisensäure gelöst und 6 Stunden bei 60°C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Lösung mit 4 N Natronlauge unter Kühlung neutralisiert und mit Wasser auf das 5-fache bis 10-fache
35 Volumen verdünnt. Zur Adsorption des gewünschten Spaltprodukts werden 100 g Kieselsäure eingerührt. Die Adsorption erfolgt während 3 Stunden unter Rühren bei 8°C. Anschließend wird die beladene Kieselsäure in

eine Chromatographiesäule gefüllt und bis zur Konstanz der Extinktion (278 nm) mit 50 mM Phosphatpuffer; 125 mM Natriumchlorid (pH 7,4) gewaschen. Die Elution des Interferons mit der Aminosäuresequenz 6-146

5 des IFN- γ erfolgt mit 7 M Guanidin; 0,1 % Tensid (auf Basis Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat); 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4). Zur Renaturierung wird das Eluat mit 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) auf das 10-fache Volumen verdünnt und 3 - 4 Stunden bei 20°C gerührt. Nach Di-

10 alyse über eine Membran mit der Ausschlußgrenze 10 000 - 12 000 Dalton, 2 x gegen je 10 l 0,6 M Ammoniumhydrogencarbonat; 10 mM Magnesiumsulfat (pH 8) und 1 x gegen 10 l 0,6 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8), wird die IFN- γ -Lösung mit 1,5 g Serumalbumin

15 versetzt und gefriergetrocknet. Man erhält 2,1 g Lyophilisat, in dem mittels Radioimmunoassay 205×10^7 Einheiten IFN- γ bestimmt werden (\approx ca. 40 mg).

Patentansprüche:

1. Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen der des Human- γ -Interferons von Aminosäure 6 (Pro) bis mindestens 127 (Ala) entspricht.
- 5 2. Proteine mit Human- γ -Interferon-Teilsequenzen, die N-terminal mit ⁶Pro beginnen und C-terminal mindestens bis zu ¹²⁷Ala reichen.
3. Human- γ -Interferon-Teilsequenz, bestehend aus der
10 Aminosäuresequenz 6 (Pro) bis 146 (Gln).
4. Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen der des Human- γ -Interferons entspricht, jedoch N-terminal bis einschließlich
15 ⁵Asp verkürzt ist, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Protein oder Fusionsprotein, das im wesentlichen die Aminosäurefolge von Human- γ -Interferon enthält, proteolytisch spaltet und das N-terminal mit Prolin beginnende Polypeptid isoliert und renaturiert.
20
5. Verfahren zur gentechnischen Herstellung der Proteine nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer Wirtszelle ein Gen zur Expression bringt, das für die Aminosäuresequenz des gewünschten Proteins
25 kodiert.
6. Arzneimittel mit Human- γ -Interferonwirkung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem Protein gemäß Anspruch 1, 2 oder 3.
30
7. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1, 2 oder 3 zur Herstellung eines Arzneimittels mit Human- γ -Interferonwirkung.

Patentansprüche Österreich, Spanien und Griechenland:

1. Verfahren zur Herstellung von Proteinen mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen der des Human- γ -Interferons entspricht, jedoch N-terminal bis einschließlich⁵ Asp verkürzt ist, dadurch gekennzeichnet, daß man ein
5 Protein oder Fusionsprotein, das im wesentlichen die Aminosäurefolge von Human- γ -Interferon enthält, proteolytisch spaltet und das N-terminal mit Prolin beginnende Polypeptid isoliert und renaturiert.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zu spaltende Protein im Anschluß an⁶ Pro die Aminosäuresequenz des Human- γ -Interferons bis¹⁴⁶ Gln hat.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltung bei 10 bis 70°C erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltung bei 20 bis 60°C erfolgt.
20
5. Verfahren zur gentechnischen Herstellung der in Anspruch 1 oder 2 definierten Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß man in einer Wirtszelle ein Gen zur Expression bringt, das für die Aminosäuresequenz des gewünschten
25 Proteins kodiert.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.